

201442024A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業

(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害の病態解明と治療法開発研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 大野 欽司

平成27(2015)年 3月



本報告書は、厚生労働省の厚生労働科学研究委託業務（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業））による委託業務として、国立大学法人名古屋大学が実施した平成26年度「神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害の病態解明と治療法開発研究」の成果を取りまとめたものです。



## 目 次

|      |  |    |
|------|--|----|
| I.   | 委託業務成果報告（総括）<br>神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害の病態解明と治療法開発研究 -----<br>大野欽司（名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授）   | 1  |
| II.  | 委託業務成果報告（業務項目）<br>1. アンチセンスによるCHRNA1遺伝子スプライシングの正常化-----<br>石浦章一（東京大学大学院総合文化研究科・分子認知科学教授） | 9  |
|      | 2. SJSにおけるカルシウム透過性異常亢進を抑制する既認可薬の同定-----<br>平澤恵理（順天堂大学大学院医学研究科・神経内科准教授（先任准教授））            | 11 |
|      | 3. 骨格筋チャネル病の分子病態解析・治療法開発に関する研究-----<br>高橋正紀（大阪大学大学院医学系研究科・神経内科学助教）                       | 14 |
| III. | 学会等発表実績 -----  | 17 |
| IV.  | 研究成果の刊行物・別刷 -----  | 21 |

# 委託業務成果報告（総括）

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))  
総括研究報告書

「神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害の病態解明と治療法開発研究」  
業務主任者 大野 欽司 名古屋大学大学院医学系研究科・神経遺伝情報学教授

研究要旨

本研究の目的は、先天的な神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害を特徴とする先天性筋無力症候群、Schwartz-Jampel 症候群、周期性四肢麻痺、先天性ミオトニア、先天性パラミオトニアの分子病態解明を行うとともに、drug repositioning 戦略・アンチセンスオリゴヌクレオチド戦略により新規治療法開発研究を行うことであり、目的に沿った研究を行った。

担当責任者

- 石浦 章一  
(東京大学大学院総合文化研究科・分子認知科学教授)
- 平澤 恵理  
(順天堂大学大学院医学研究科・神経内科准教授 (先任准教授))
- 高橋 正紀  
(大阪大学大学院医学系研究科・神経内科学助教)

A. 研究目的

本研究グループは、先天性筋無力症候群 (congenital myasthenic syndrome, CMS), シュワルツジャンペル症候群 (Schwartz-Jampel syndrome, SJS), 周期性四肢麻痺 (periodic paralysis, PP), 先天性ミオトニア (myotonia congenita, MC), 先天性パラミオトニア (paramyotonia congenita, PMC) の本邦における診断基準を作成するとともに、遺伝子診断・病態機能解析・治療法開発研究の本邦における中核を担ってきた。また、国立精神神経医療研究センター・木村円代表による「難治性筋疾患の疫学・自然歴の収集および治療開発促進を目

的とした疾患レジストリー研究」の分担研究者として、患者への情報発信を含む双方向のコミュニケーションが可能な患者レジストリーの構築を計画している。これらの研究基盤に基づき、本研究は、神経筋接合部分子構築機構の解明研究を行うとともに、CMS, SJS, PP, MC, PMC のさらなる分子遺伝学解析・分子病態学解析を行い、モデル細胞系ならびに患者由来 iPS 細胞系を用いた新規治療法開発研究を行うことを目的とする。CMS, SJS は本邦の確定診断例は極めて少なく未診断例・誤診断例が数多く存在することが予想されており、本研究においてエキソーム解析による遺伝子診断を実施するとともに変異分子の病態分子機構の解明研究を実施する。また、遺伝子変異を同定できない PP も本邦に数多く存在し、エキソーム解析による遺伝子変異同定と変異イオンチャネルの機能解析を実施する。本研究が対象とする疾患はいずれも希少難治性疾患であり製薬メーカーが独自に新薬を開発することが期待をされず、既認可薬の新規薬効を同定するドラッグリポジショニング研究、ならびにアンチセンスオリゴによる mRNA 代謝制御研究を実施し、

ベンチトップ研究成果の迅速なベッドサイド臨床への応用を目指す。

## B. 研究方法

### ①新規に同定をした神経筋接合部構築誘導因子の機能解析

脊髄前角細胞の laser capture microdissection (LCM)解析により、脊髄前角細胞特異的に発現する分子を同定し、その分子のノックアウトマウスの形態学的・生化学的・電気生理学的な解析により同定した分子の NMJ 構築誘導作用機構を明らかにする。

### ②CMS・SJS・PP の新規遺伝子変異解析

CMS・SJS・PP のエキソーム解析にて同定をした 10 種類の遺伝子変異の生化学的解析・細胞生物学解析を行う。さらに、本研究の対象疾患群のさらなるエキソーム解析を進める。

### ③iPS 樹立拠点機関と連携をした患者由来 iPSC による分子病態機構解明

iPS 樹立拠点機関（京都大学 CiRA, NCNP）との共同研究により、PP-iPSC, CMS-iPSC, SJS-iPSC の樹立を行う。

### ④アセチルコリン受容体(AChR)クラスター促進既認可薬の同定

C2C12 筋管細胞を用いて agrin 存在下において AChR クラスター形成を促進する 6 種類の薬剤を、1186 種類の既認可薬のスクリーニングにより同定をした(未発表)。ヒト骨格筋由来 Hu5/KD3 細胞株（国立長寿医療研究センター橋本有弘部長より分与）、正常ヒト iPSC 由来筋管細胞、CMS-iPSC 由来筋管細胞において効果を検証する。

### ⑤SJS におけるカルシウム透過性異常亢進を抑制する既認可薬の同定

SJS-iPSC より筋芽細胞を作成し、Fura2 による Ca imaging を用いて、SJS において異常

亢進をしたカルシウム透過性を抑制する既認可薬のスクリーニングを行う。

### ⑥アンチセンスオリゴによるスプライシング制御研究

本研究グループは AChR $\alpha$  サブユニットの遺伝子変異による exon P3A の異常スプライシング機構を報告してきた(*Hum Mol Genet* 2008, 2009; *Sci Rep* 2013)。本研究では exon P3A のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴを同定する。

#### (倫理面への配慮)

本プロジェクトにおける遺伝子変異解析は、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成20年12月1日一部改正)」に則り行った。疾患特異的 iPSC 樹立は、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)」に則り行った。いずれの研究も、参加各施設の生命倫理委員会の承認を得た後に、参加者の書類による同意を得て行った。

組み換え DNA 実験と動物実験は、参加各施設の組み換え DNA 実験指針・動物実験指針、ならびに、カルタヘナ法を遵守し、参加各施設長の承認を得て進めた。

## C. 研究結果

### ①新規に同定をした神経筋接合部構築誘導因子の機能解析

マウス脊髄より約 2000 個の脊髄前角細胞 (spinal motor neuron, SMN) を laser capture microdissection (LCM) 法により単離し、Affymetrix exon array 解析ならびに RNA-seq 解析を行った。脊髄後角の細胞群をコントロールとして解析を行い R-spondin 2 (Rspo2) が SMN に特異的に高発現していることを見いだすとともに、*in situ hybridization* により確認を行った。Rspo2 ノックアウトマウスの解析にて、Rspo2 は脊髄における SMN 細胞数に影響

響を与えず、横隔膜神経の分岐パターンにも影響を与えなかった。一方、Rspo2 ノックアウトマウスは横隔膜の NMJ 領域が拡大し、NMJ における神経終末とアセチルコリン受容体 (AChR) の共局在が減弱していた。電子顕微鏡でも神経終末と筋終板の構造の破壊を認めた。さらに反復神経刺激にて筋複合活動電位の異常減衰を認め、微小終板電位 (MEPP) の頻度も顕著に減少していた。

培養細胞による解析では、Rspo2 は agrin 非存在下に AChR 集積活性を示した。Rspo2 による AChR 集積活性は agrin の約 80% であった。さらに NMJ に膜タンパク受容体 Lgr5 が高度に発現することを見だし、Lgr5 のノックダウンにより Rspo2 の AChR 集積活性が消失することを見だし、Lgr5 が NMJ における Rspo2 の受容体であることを同定した。

## ② CMS・SJS・PP の新規遺伝子変異解析

CMS のエキソーム解析にて CMS において従来遺伝子変異が報告をされていない LRP4 遺伝子に新規ミスセンス変異を同定した。

神経終末から放出をされる agrin は筋終板膜の LRP4 に結合し、LRP4 と共受容体を形成する膜タンパク MuSK のリン酸化を誘導する。リン酸化 MuSK はアセチルコリン受容体 (AChR)  $\beta$  サブユニットのリン酸化を誘導することにより AChR を筋終板へ集積をさせる。同時に LRP4 は特に骨において Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルに対する抑制性受容体として働く。LRP4 は AChR 集積に関与する重要な分子であるにも関わらず、LRP4 遺伝子変異は CMS においては報告をされておらず、Cenani-Lenz syndactyly syndrome, sclerosteosis-2, low bone mineral density の 3 種類の骨病態において報告をされてきた。

CMS の一例において LRP4 の p.Glu1233Lys (EK) 変異と p.Arg1277His (RH)

変異を同定した。EK 変異と RH 変異は、agrin ならびに MuSK に対する LRP4 の結合能を低下させると同時に、MuSK リン酸化を低下させ、MuSK 下流の ATF2 レポーター活性を減弱させた。一方、LRP4 による Wnt 抑制効果には影響を与えなかった。これらの変異と同一ドメインに存在する p.Arg1170Trp (RW) 変異と p.Trp1186Ser (WS) 変異が sclerosteosis-2 において報告をされている。上記と同様のアッセイを行ったところ、RW 変異と WS 変異は、agrin ならびに MuSK に対する LRP4 結合、MuSK リン酸化、ATF2 レポーター活性に影響を与えなかった。一方、これらの変異は LRP4 による Wnt 抑制効果を減弱させた。

3D モデリングにより EK 変異と RH 変異は LRP4 の第 3 ベータプロペラドメインの外周に位置し、RW 変異と WS 変異は同ドメイン中央部に位置することが予測をされた。さらに、人工的なアミノ酸置換をドメイン外周部に 2 カ所、ドメイン中央部に 2 カ所導入し、上記と同様のアッセイを行うことにより、ドメイン外周部は agrin/LRP4/MuSK シグナル系に関与をし、ドメイン中央部は Wnt シグナル系に関与をすることを明らかにした (*Hum Mol Genet* 2014)。

PP を呈する Anderson-Tawil 症候群のエキソーム解析にて、従来遺伝子変異が報告されていない Kir3.4 (*KCNJ5*) に p.G387R 変異を同定した。Kir3.4 が骨格筋・心筋に発現をすることを確認するとともに、PP において変異が報告されている Kir2.1 (*KCNJ2*) と共発現を行った。正常 Kir3.4 は Kir2.1 に対して抑制的に作用をすることを明らかにするとともに、変異 Kir3.4 は Kir2.1 に対してさらに強い抑制効果を示すことを明らかにした (*Neurology* 2014)。

本邦第 2 例目の SJS において HSPG2 の 2 変異 (p.L1088P, p.Q3061X) を同定した。Perlecan domain III-2 に p.L1088P を導入す

ることにより domain III-2 の細胞外分泌が著しく低下することを明らかにし、domain III-2 が perlecan の細胞外分泌に必須のドメインであることを明らかにした(submitted)。

### ③iPS 樹立拠点機関と連携をした患者由来 iPSC による分子病態機構解明

疾患特異的 iPSC 樹立に関して各機関の生命倫理委員会の承認を得た。iPS 樹立拠点機関（京都大学 CiRA, NCNP）との共同研究により、PP-iPSC, CMS-iPSC, SJS-iPSC の樹立を現在行っている。

### ④アセチルコリン受容体(AChR)クラスター促進既認可薬の同定

C2C12 筋管細胞を用いて agrin 存在下において AChR クラスター形成を促進する 6 種類の薬剤を、1186 種類の既認可薬のスクリーニングにより同定をした(未発表)。マウス骨格筋由来 C2C12 細胞株、ヒト骨格筋由来 Hu5/KD3 細胞株 (国立長寿医療研究センター橋本有弘部長より分与)、正常ヒトプライマリー筋芽細胞 SkMC において濃度依存的に AChR クラスター形成を促進することを同定した。さらに、neurotization mouse model を作成し、骨格筋量の増量効果、CMAP の増強効果を確認した。

### ⑤SJS におけるカルシウム透過性異常亢進を抑制する既認可薬の同定

SJS-iPSC を現在樹立中であり、本報告書作成段階では予備的なデータを得ていない。

### ⑥アンチセンスオリゴによるスプライシング制御研究

AChR $\alpha$  サブユニットの遺伝子変異における exon P3A のスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴを同定した。

## D. 考察

Rspo2 が NMJ 形成を誘導する agrin につぐ新規分子であることを同定した。CMS, PP,

SJS における遺伝子変異の解析を行った。iPSC の樹立を開始した。AChR クラスター形成を促進する既認可薬を同定し、細胞とモデルマウスにおける効果を確認した。アンチセンスオリゴによるエクソンスキッピングを誘導するアンチセンスオリゴを同定した。

## E. 結論

CMS, SJS, PP, MC はいずれも希少疾患であり、今後とも病態解析と共に drug repositioning 戦略による新規治療法開発研究を続ける。

## F. 健康危険情報

業務主任者の施設においても、担当責任者の施設においても、特記事項はなかった。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

#### (Original Article)

1. Ohkawara B, Cabrera-Serrano M, Nakata T, Milone M, Asai N, Ito K, Ito M, Masuda A, Ito Y, Engel AG, Ohno K. LRP4 third beta-propeller domain mutations cause novel congenital myasthenia by compromising agrin-mediated MuSK signaling in a position-specific manner. *Hum Mol Genet* 2014, 23: 1856-1868.
2. Kokunai Y\*, Nakata T\*, Furuta M\*, Sakata S, Kimura H, Aiba T, Yoshinaga M, Osaki Y, Nakamori M, Itoh H, Sato T, Kubota T, Kadota K, Shindo K, Mochizuki H, Shimizu W, Horie M, Okamura Y, Ohno K, Takahashi M. A Kir3.4 mutation causes Andersen-Tawil syndrome by an inhibitory effect on Kir2.1. *Neurology* 2014, 82: 1058-1064. \*Equal contribution.



3. Mano Y, Kotani T, Ito M, Nagai T, Ichinohashi Y, Yamada K, Ohno K, Kikkawa F, Toyokuni S. Maternal molecular hydrogen administration ameliorates rat fetal hippocampal damage caused by in utero ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2014, 69: 324-330.
4. Takamatsu A, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Sakai T, Ishiguro N, Ohno K. Verapamil protects against cartilage degradation in osteoarthritis by inhibiting Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *PLOS ONE* 2014, 9: e92699.
5. Kobayashi M, Ohno T, Ihara K, Murai A, Kumazawa M, Hoshino H, Iwanaga K, Iwai H, Hamana Y, Ito M, Ohno K, Horio F. Searching for genomic region of high-fat diet-induced type 2 diabetes in mouse chromosome 2 by analysis of congenic strains. *PLoS ONE* 2014, 9: e96271.
6. Yamashita Y\*, Matsuura T\*, Kurosaki T, Amakusa Y, Kinoshita M, Ibi T, Sahashi K, Ohno K. LDB3 splicing abnormalities are specific to skeletal muscles of patients with myotonic dystrophy type 1 and alter its PKC binding affinity. *Neurobiol Disord* 2014, 69: 200-205. \*Equal contribution.
7. Asai N, Ohkawara B, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. LRP4 induces extracellular matrix productions and facilitates chondrocyte differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2014, 451: 302-307.
8. Nasrin F, Rahman MA, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K. HnRNP C, YB-1 and hnRNP L coordinately enhance skipping of human MUSK exon 10 to generate a Wnt-insensitive MuSK isoform. *Sci Rep* 2014, 4: 6841.
9. Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine Promotes Longitudinal Skeletal Growth in Transgenic Mice with Achondroplasia Carrying a Gain-of-Function Mutation in the FGFR3 Gene. *Endocrinology*, in press.
10. Azuma Y, Nakata T, Tanaka M, Shen XM, Ito M, Iwata S, Okuno T, Nomura Y, Ando N, Ishigaki K, Ohkawara B, Masuda A, Natsume J, Kojima S, Sokabe M, Ohno K. Congenital myasthenic syndrome in Japan: Ethnically unique mutations in muscle nicotinic acetylcholine receptor subunits. *Neuromuscular Disorders* 2015, 25: 60-69.
11. Funayama M, Ohe K, Amo T, Furuya N, Yamaguchi J, Saiki S, Li Y, Ogaki K, Ando M, Yoshino H, Tomiyama H, Nishioka K, Hasegawa K, Saiki H, Satake W, Mogushi K, Sasaki R, Kokubo Y, Kuzuhara S, Toda T, Mizuno Y, Uchiyama Y, Ohno K, Hattori N. Identification of a gene associated with autosomal dominant late-onset Parkinson's disease: a genome-wide linkage and sequencing study. *Lancet Neurol*, in press.
12. Tsunoda M, Hirayama M, Tsuda T, Ohno K. Noninvasive monitoring of plasma L-Dopa concentrations using sweat samples in Parkinson's disease. *Clinica Chimica Acta*, in press.

13. Sobue S, Yamai K, Ito M, Ohno K, Ito M, Iwamoto T, Qiao S, Ohkuwa T. Simultaneous oral and inhalational intake of molecular hydrogen additively suppresses signaling pathways in rodents. *Mol Cell Biochem*, in press.

**(Review and Book Chapters)**

1. Ohno K, Ito M, Kawakami Y, Ohtsuka K. Collagen Q is a key player for developing rational therapy for congenital myasthenia and for dissecting the mechanisms of anti-MuSK myasthenia gravis. *J Mol Neurosci* 2014, 53: 359-361. (査読有)
2. Noda M, Fujita K, Ohsawa I, Ito M, Ohno K. Multiple effects of molecular hydrogen and its distinct mechanism. *J Neurol Disord* 2014, 2: 6 (査読有)
3. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohno K. Decoding abnormal splicing code in human diseases. *J Invest Genomics* 2015, 2(1): 00016 (査読有)
4. Noda M, Ito M, Ohsawa I, Ohno K. Beneficial effects of hydrogen in the CNS and a new brain-stomach interaction. *Eur J Neurodegener Dis* (in press) (査読有)

**2. 学会発表**

**(Presentation, English)**

1. Shibata A, Okuno T, Masuda A, Ohno K P16.49-S - IntSplice: A tool to predict the effect on pre-mRNA splicing of intronic nucleotide substitutions The European Society of Human Genetics 2014 (Poster), Milan, Lombardy, Italy

May 31-June 3, 2014

2. Ohno K, Shibata A, Okuno T, Rahman MA, Azuma Y, Masuda A IntSplice: A tool to predict aberrant splicing of an SNV at intronic positions -50 to -3 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA Oct 18-22, 2014
3. Bruun GH, Doktor TK, Brøner S, Masuda A, Palhais B, Krainer AR, Ohno K, Andresen BS Global identification of binding sites for the splicing regulatory factors SRSF5 and hnRNPA1 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (Poster), San Diego, California, USA Oct 18-22, 2014
4. Rahman MA, Nasrin F, Masuda A, Ohe K, Takeda J, Ohno K Alternative splicing of human MUSK exon 10 is physiologically regulated by multiple splicing regulatory cis-elements and cognate trans-factors RNA Biology meeting, Cold Spring Harbor Asia Conference (Poster), Suzhou, China Nov 10-14, 2014

**(Invited Presentation)**

1. Ohno K Maintenance of the neuromuscular junction and its aberrations in hereditary and autoimmune disorders



Guarda-Symposium 2014 on the  
Molecular and Cell Biology of the  
Neuromuscular System, Guarda,  
Switzerland

Sep 1, 2014

H. 知的所有権の取得状況  
なし

# 委託業務成果報告（業務項目）



厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))  
委託業務成果報告

「アンチセンスによる *CHRNA1* 遺伝子スプライシングの正常化」  
担当責任者 石浦 章一 東京大学大学院総合文化研究科・教授

**研究要旨**

アセチルコリン受容体  $\alpha 1$  サブユニットの遺伝子変異により、スプライシングが変化して発症する先天性重症筋無力症の治療のため、アンチセンス法を検討した。その結果、適切にアンチセンスを使用することにより、培養細胞系でスプライシングを正常化させることに成功した。

**A. 研究目的**

ヒトの運動神経と筋肉を仲介する神経筋接合部では、神経伝達物質のアセチルコリンが運動神経の興奮を筋肉に伝えている。先天性筋無力症候群は、アセチルコリンを介したシグナル伝達に関わる数多くの遺伝子変異により発症することが知られているが、このほとんどが、正常なアセチルコリン受容体機能が果せないことが原因である。

このニコチン性アセチルコリン受容体は、5量体として機能している。アセチルコリンが結合するのは  $\alpha$  サブユニットである。このサブユニットには  $\alpha 1$  から  $\alpha 10$  までの 9 種類 ( $\alpha 8$  が不在) がある。本研究では *CHRNA1* 遺伝子に焦点を絞って研究を行った。

**B. 研究方法**

この *CHRNA1* 遺伝子上には、スプライシングパターンを変える 2 種類の点変異が先天性筋無力症候群の患者から同定されている。イントロン 3 上の -8G>A とエキソン P3A 上の 23'G>A である。*CHRNA1* 遺伝子は、選択的スプライシングを受けることが知られており、エキソン P3A が挿入された P3A(+) と挿入されない P3A(-) の 2 つのスプライシングバリエーションが見られ、前者の P3A(+) では正常な機能をもつ受容体を形成できない。患者から発見された 2 種類の変異は、この 2 つのスプライシングバリエーションの割合を大きく

変化させ、大部分を機能不全の P3A(+) が占めて、正常な受容体の構成に必要な P3A(-) を大幅に減少させている。

エキソン P3A の認識に関わるスプライシング因子が結合する *pre-mRNA* の部位を、その部位と相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドで塞ぐことでエキソン挿入を阻害することを目指した。

まず、*CHRNA1* 遺伝子のエキソン 2 から 4 を含むミニジーンとヌクレアーゼ耐性を高め RNA への結合力を上げる人工修飾を施したオリゴヌクレオチドを培養細胞 HEK293 に導入し、48 時間後に RNA を回収してアンチセンスオリゴヌクレオチドの影響を評価した。またその際、ミニジーンには上記 2 種類の点変異をそれぞれ導入したものをを用いた。アンチセンスは、イントロン 3 のポリピリミジン結合領域、エキソン P3A の 3' スプライス部位、5' スプライス部位に設計した。

(倫理面の配慮)

今回は、患者材料は使わなかったため、倫理的な問題は生じない。

**C. 研究結果**

本年度の研究では、*CHRNA1* 遺伝子変異によってエキソン P3A の挿入が増加する現象を、アンチセンス法を用いて正常に近づけることを目標とした。その結果、すべてのアンチセンスで正常スプライシングが増強されたが、特に 5' スプ

ライス部位のアンチセンスの効果が一番高かった。アンチセンスには濃度依存性があり、0.25nMから2nMまで変化させたところ、濃度の高いものほど正常化効果が認められた。

#### D. 考察

正常スプライシングを増強させるには、アンチセンス投与が効果的であることが明らかとなった。また、アンチセンス配列を最適化することにより、効果が得られることもわかった。今後は、筋肉への導入法が一番の問題になることがわかった。

#### E. 結論

*CHRNA1* 遺伝子変異をもつ先天性筋無力症候群は、アンチセンスで治療する可能性があることが初めて明らかになった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Ohsawa, N., Koebis, M., Mitsuhashi, H., Nishino, I. & Ishiura, S. (2015) ABLIM1 splicing is abnormal in skeletal muscle of DM1 patients and regulated by MBNL, CELF and PTBP1. *Genes to Cells*, 20, 121-134
- 2) Kino, Y., Washizu, C., Kurosawa, M., Ona, Y., Hattori, N., Ishiura, S. & Nukina, N. (2015) Nuclear localization of MBNL1:

Splicing-mediated autoregulation and repression of repeat-derived aberrant proteins. *Hum.Mol.Genet.* 24, 740-756

- 3) Yoshida, M., Oami, E., Wang, M., Ishiura, S. & Suo, S. (2014) Non-redundant function of two highly homologous octopamine receptors in food deprivation-mediated signaling in *C. elegans*. *J.Neurosci.Res.* 92, 671-678
- 4) Soma, M., Wang, M., Suo, S. & Ishiura, S. (2014) Dysbindin-1, a schizophrenia-related protein, interacts with HDAC3. *Neuroscience Lett.* 582, 120-124

##### 2. 学会発表

なし

#### G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
特になし
2. 実用新案登録  
特になし
3. その他  
特になし



厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))  
委託業務成果報告

「SJSにおけるカルシウム透過性異常亢進を抑制する既認可薬の同定」

担当責任者 平澤恵理 順天堂大学大学院医学研究科

老人性疾患病態治療研究センター・先任准教授

研究要旨

分担者は SJS の筋症状を改善する治療手段を既認可薬の応用から進める事業を分担する。これまでに分担者が進めた研究成果から、細胞内カルシウム濃度の異常変動が SJS の病態を制御すると考えており、カルシウム濃度を制御する既認可薬の同定を目指す。

A. 研究目的

本研究事業全体の目的は、先天的な神経筋接合部・骨格筋の興奮伝達障害を特徴とする先天性筋無力症候群(congenital myasthenic syndromes, CMS)、Schwartz-Jampel 症候群(SJS)、周期性四肢麻痺(periodic paralysis, PP)、先天性ミオトニア(myotonia congenita, MC)、先天性パラミオトニア(paramyotonia congenita, PMC)の分子病態解明を行うとともに、drug repositioning 戦略・アンチセンスオリゴヌクレオチド戦略により新規治療法開発研究を行うことである。分担者は SJS の筋症状を改善する治療手段を既認可薬の応用から進める事業を分担する。これまでに分担者が進めた研究成果から、細胞内カルシウム濃度の異常変動が SJS の病態を制御すると考えており、カルシウム濃度を制御する既認可薬の同定を目指す。

B. 研究方法

SJS おいて、カルシウムホメオスターシスの異常がミオトニア事象をもたらすと考え、その異常機構の生理学的解析と、分子機構の解明を計画している。細胞内のカルシウム濃度は、細胞外からの流入、細胞内カルシウムストアからの放出、カルシウムポンプによる細胞外への排出により維持され、その異常は細胞のストアからの放出、カルシウムポンプによる細胞外への排出により維持され、その異常は細胞の機能と生死に深く関わることが知られている。例えば、細胞内カルシウ

ム濃度の上昇は白内障や、神経細胞死を引き起こすこと等が知られている。SJS においては白内障の合併も知られており、興味を持たれる。特に収縮機能をもつ筋細胞においてはカルシウムが骨格筋と平滑筋の収縮機構には神経支配受容体等の違いはあるが、カルシウムホメオスターシスの維持機構は共通している。そこで、我々は、骨格筋、平滑筋、内皮細胞の3種類の初代培養細胞のカルシウムイメージングを行い、細胞の継代条件、播種濃度条件などを検討した。カルシウムインジケーターとしては Fura2 及び Fluo4 を用いて検討した。筋芽細胞を作成し、Fura2/Fluo4 によるカルシウムイメージングを用いて、SJS において異常亢進をしたカルシウム透過性を抑制する既認可薬のスクリーニングを行うため、SJS-iPSC 入手の準備を進める。マウス C2C12 由来 P 筋芽細胞及び、SJS-iPSC 由来筋芽細胞を用いてカルシウム毒性抑制効果の分子作用機構の解明研究を行う。

(倫理面への配慮)

iPS 細胞樹立の準備は順天堂大学医学部倫理委員会の承認を受けた後に、患者への説明と文書による同意に基づいて開始した。遺伝子変異解析は名古屋大学医学部生命倫理委員会の承認を得ている。治療研究を開始する場合には、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年厚生労働省告示第415号)」に則り、順天堂大学及び名古屋大学の倫理委員会の承認を得た後に進める。

組み換え DNA 実験と動物実験は順天堂大学及び名古屋大学の承認を得ている。動物実験は、カルタヘナ法、ならびに、順天堂大学の動物実験委員会の承認を得て動物実験指針を遵守して研究を進める。ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針（平成16年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号）に従う。

### C. 研究結果

骨格筋、平滑筋、内皮細胞の3種類の初代培養細胞のカルシウムイメージングを行い、条件を決定した。骨格筋に関しては、筋幹細胞の分化状態を一定にしてカルシウムイメージングを行なう必用が有ると考えられた。平滑筋に関しては、3、4継代までの細胞を用いてカルシウムイメージングを行なうことにより、安定した結果が得られることが判った。大動脈内皮細胞を用いてイメージングを行なったが、パールカン欠損細胞では接着、増殖が悪く、タンパク質解析には十分な細胞数が得られなかった。これまでに片側アリルに遺伝子変異が検出されていた SJS 1 例に対しホールゲノムシーケンスを行い、2つ目の新しい遺伝子変異を検出した（論文投稿中）ことにより、ヒト iPS 細胞の樹立準備に入った。

### D. 考察

ヒト iPS 細胞の樹立のための準備を開始している。骨格筋、平滑筋、内皮細胞の3種類の培養細胞を使った薬剤スクリーニングも各々重要であるが、神経の関与も反映するため、神経筋接合部モデルの確立も重要と考えられた（京都大学 iPS 研究所との共同研究にて準備中）。

### E. 結論

遺伝子欠損細胞を使った細胞モデルで検証した事象を iPS 細胞から誘導した NMJ モデル系に応用して治療薬候補の選定を進める準備を整えた。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1 Furuya N, Ikeda SI, Sato S, Soma S, Ezaki J, Trejo JA, Takeda-Ezaki M, Fujimura T, Arikawa-Hirasawa E, Tada N, Komatsu M, Tanaka K, Kominami E, Hattori N, Ueno T. PARK2/Parkin-mediated mitochondrial clearance contributes to proteasome activation during slow-twitch muscle atrophy via NFE2L1 nuclear translocation. *Autophagy*. Apr;10(4):631-41 2014
- 2 de Vega S, Suzuki N, Nonaka R, Sasaki T, Forcinito P, Arikawa-Hirasawa E, Yamada Y. A C-terminal fragment of fibulin-7 interacts with endothelial cells and inhibits their tube formation in culture. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Jan 27
- 3 Ning L, Kurihara H, de Vega S,\* Ichikawa-Tomikawa n, Xu Z, Nonaka R, Kazuno S, Yamada Y, Miner JH, Arikawa-Hirasawa E, Laminin  $\alpha$ 1 regulates age-related mesangial cell proliferation and mesangial matrix accumulation through the TGF $\beta$  pathway *The American Journal of Pathology* . 2014 Jun;184(6):1683-9
- 4 Nonaka R, Iesaki T, de Vega S, Daida H, Okada T, Sasaki T, and Arikawa-Hirasawa E Perlecan deficiency causes endothelial dysfunction by reducing the expression of endothelial nitric oxide synthase. *Physiological Reports* in press

### 2. 学会発表

- 1 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana de Vega, Yoshihiko Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa . The role of the extracellular matrix protein Perlecan in the arterial wall. *Experimental Biology* 4.26-30 2014 San diego, USA
- 2 平澤恵理、岩田哲、野中里紗、服部信孝、中田智彦、伊藤美佳子、大野欽司 Schwartz-Jampel 症候群の原因遺伝子、パールカンの機能部分欠損変異の機能解析第 55 回日本神経学会学術大会



- 2014.5.21-24 (福岡)
- 3 野中里紗、家崎貴文、Susana de Vega、Aurelien Kerever、山田 吉彦、平澤 (有川) 恵理 大動脈構造や機能におけるペー  
ルカンの役割第 46 回日本結合組織学会・  
第 61 回マトリックス研究会合同学術集会  
2014.6.7-8(名古屋)
  - 4 Risa Nonaka, Takafumi Iesaki, Susana  
de Vega., Aurelien Kerever, Yoshihiko  
Yamada, Eri Arikawa-Hirasawa Role of  
Perlecan in the Structural Integrity and  
Function of the Aorta. Gordon Research  
Conference on proteoglycan 2014.7.6-11  
New Hampshire, USA
  - 5 Eri Arikawa-Hirasawa "Role of Perlecan  
in Neurogenesis and Ageing" Gordon  
Research Conference on proteoglycan  
2014.7.6-11
  - 6 Liang Ning, Hidetake Kurihara, Susana  
de Vega, Risa Nonaka, Eri  
Arikawa-Hirasawa Role of Laminin  $\alpha$ 1  
in mesangial cell proliferation and  
mesangial matrix accumulation 第 46 回  
日本結合組織学会・第 61 回マトリックス  
研究会合同学術集会 2014.6.7-8(名古屋)
  - 7 Takenori Inomata, Toru Matsunaga,

Nobuyuki Ebihara, Akira Murakami,  
Eri Arikawa-Hirasawa  
Perlecan-deficient Mutation Impairs  
Homeostasis and Wound Healing in  
Mouse Corneal Epithelium Gordon  
Research Conference on proteoglycan  
2014.7.6-11

- 8 Susana de Vega, Eimi Seo, Anna Takeda,  
Nobuharu Suzuki, Risa Nonaka,  
Kentaro Hozumi, Motoyoshi Nomizu,  
Yoshihiko Yamada, and Eri  
Arikawa-Hirasawa Identification of  
Fibulin-7 Peptides Active for  
Endothelial Cell Adhesion and Tube  
Formation 第 46 回日本結合組織学会・第  
61 回マトリックス研究会合同学術集会  
2014.6.7-8(名古屋)

#### G. 知的所有権の取得状況

##### 1 : 特許取得

特記事項なし。

##### 2 : 実用新案登録

特記事項なし。

##### 3 : その他

特記事項なし。

厚生労働科学研究委託費  
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業)))  
委託業務成果報告

「骨格筋チャネル病の分子病態解析・治療法開発に関する研究」  
担当責任者 高橋 正紀 大阪大学大学院医学系研究科・神経内科学講師

研究要旨

骨格筋チャネル病の病態について、原因遺伝子異常を中心に解析した。筋強直の原因となりうる二つの遺伝子に変異を認めた例を見出した。非典型例では複雑な遺伝的異常も念頭に遺伝子解析が必要であることが示された。また、ゲーティングチャージに変化のない低カリウム性周期性四肢麻痺の変異を見出した。ゲーティングポア電流仮説に一石を投ずる発見である。

A. 研究目的

骨格筋においては、非ジストロフィー性ミオトニー症候群や周期性四肢麻痺が代表的なチャネル病として知られている。非ジストロフィー性ミオトニー症候群(先天性ミオトニーや先天性パラミオトニーなど)については、遺伝子(塩化物イオンチャネル、骨格筋型 Na チャネル)の変異が、チャネルの機能異常(電流量低下、速い不活化の異常など)を呈し、筋強直症状をきたすという病態機序が明らかになっている。しかしながら、同一家系内でも症状に大きな違いが見られたりする例が存在し、genotype-phenotype correlation については、十分明確になっていない。

いっぽうで低カリウム性周期性四肢麻痺については原因遺伝子の同定、病態機序の解明も不十分な現状である。低カリウム性周期性四肢麻痺の原因遺伝子として、骨格筋型 Ca チャネルと Na チャネルが同定されている。興味深いことに、電位感受性ドメインの中核センサーであるセグメント 4 (S4) にあるアルギニン残基に、両チャネルのほとんどの変異が存在する。二つの機能の異なるチャネルにおけるこれらの変異が引き起こす共通の現象として、ゲーティングポア電流と呼ばれる、通常のイオン透過孔とは別経路による漏

洩電流が示され、本症の病態にかかわっている可能性が示されている。これまでの低カリウム性周期性四肢麻痺の遺伝子解析は、ドメイン I から IV の電位センサー(セグメント 4)を含むエクソン領域だけをスクリーニングするのが通常であった。一次元配列上は離れていても、三次元立体構造上は電位センサー近傍に位置し、ゲーティングポア電流に影響を与える変異が存在することが想定される。

B. 研究方法

genotype-phenotype correlation についての疑問を明らかにするために、変異がすでに見つかっているものの非典型的な症状を示す非ジストロフィー性ミオトニー症候群の例について、骨格筋型 Na、Cl チャネルについてサンガー法で全エクソン領域の変異を解析した。

いっぽう、疾患が強く疑われるにもかかわらずスクリーニング解析で異常を認めない低カリウム性周期性四肢麻痺の例については、骨格筋型 Na、Ca チャネルの全エクソン領域をサンガー法で解析した。

変異の見つかったチャネルについては、培養細胞(HEK293)に発現させパッチクランプ法を用いて、チャネル機能の解析を行った。

(倫理面への配慮)

患者の遺伝子に関わる研究、患者情報を用いた研究については、それぞれ大阪大学ヒトゲノム研究審査委員会、大阪大学医学部附属病院倫理委員会にて承認済みである。同意を文書にて得て、連結可能匿名化を行い個人情報保護に最大限の配慮をすることなど「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」などを遵守し行った。

## C. 研究結果

非典型的な非ジストロフィー性ミオトニー症候群の発端者に、*CLCN1* と *SCN4A* 遺伝子に変異を見出した。発端者は、学童期よりの四肢筋のこわばりと麻痺発作を主訴とし、周期性四肢麻痺発作をもつミオトニー症候群と考えられたが、母親に麻痺発作はなくミオトニーのみを認めた。発端者には *CLCN1* 遺伝子の変異 E950K と *SCN4A* 遺伝子の新規変異 F1290L を、母親には *CLCN1* 遺伝子の同変異のみを認め、父には両遺伝子に異常を認めず、*SCN4A* 遺伝子変異は *de novo* であった。変異 Na チャネルの機能解析を行ったが、軽微な機能異常にとどまり、そのみで症状を呈するほどの機能的変化を認めなかったことから、Thomsen 病の病態が、*SCN4A* 遺伝子変異により修飾された可能性が疑われた。

いっぽうで、低カリウム性周期性四肢麻痺の電位依存性 Na、Ca チャネルの遺伝子解析の結果、ゲーティングチャージに変化のない遺伝子変異を認めた。機能解析を現在進めている。

## D. 考察

非典型的な骨格筋チャンネル病のなかには、二つの遺伝子異常を伴うことがあることが示されたことから、変異ホットスポットのみの解析ではなく、原因遺伝子の全エクソンのシークエンスが重要であることが示された。エクソンが 20 以上の遺伝子の解析を複数行うためには、次世代シーク

エンサーを用いた効率的な解析システムの確立が今後必要と考えられる。

いっぽう、低カリウム性周期性四肢麻痺の電位依存性 Na、Ca チャネルの遺伝子解析の結果、ゲーティングチャージに変化のない遺伝子変異を認めたこと。この結果は予想外であり、従来の、ゲーティングポア電流仮説に疑問を呈するものである。今後、これらの変異チャンネルの機能解析を行うことが、低カリウム性周期性四肢麻痺の病態に新知見を与えることが予想される。

## E. 結論

骨格筋チャンネル病について複雑な遺伝的異常が存在する例が存在することが明らかになった。また、低カリウム性周期性四肢麻痺のゲーティングポア電流仮説に一石を投ずる変異を見出した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Yoshinaga H, Sakoda S, Shibata T, Akiyama T, Oka M, Yuan J-H, Takashima H, Takahashi MP, Kitamura T, Murakami N, Kobayashi K  
Phenotypic variability in childhood of skeletal muscle sodium channelopathies. *Pediatric Neurology*. in press.

久保田智哉 高橋正紀 骨格筋チャンネル病の最新知見—ミオトニー症候群と周期性四肢麻痺を中心に 別冊 医学のあゆみ イオンチャンネル病のすべて pp. 38-45 2014

高橋正紀 周期性四肢麻痺 今日の整形外科治療指針 第7版 印刷中

### 2. 学会発表

古田 充、中田智彦、穀内洋介、坂田宗平、木村絃美、相庭武司、吉永正夫、大崎裕亮、中森雅之、



伊藤英樹、佐藤貴子、久保田智哉、門田一繁、進藤克郎、望月秀樹、清水 渉、堀江 稔、岡村康司、大野欽司、高橋正紀 Kir3.4 変異は Kir2.1 に対する抑制作用を通して Andersen-Tawil 症候群を引き起こす。第 55 回日本神経学会学術大会 平成 26 年 5 月 23 日 福岡

加藤秀紀、湯浅浩之、三竹重久、打田佑人、池田知雅、間所佑太、穀内洋介、高橋正紀 遺伝子解析にて診断しえた Thomsen 病 3 例の臨床像と電気生理学的検査の検討 第 55 回日本神経学会学術大会 平成 26 年 5 月 福岡

#### G. 知的所有権の取得状況

1 : 特許取得

なし

2 : 実用新案登録

なし

3 : その他

なし